云 南 植 物 研 究 7(1): 1—10, 1985
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔甜味蛋白的研究Ⅱ.甜蛋白Ⅱ和甜蛋白Ⅰ的比较*

胡 忠 彭丽萍 何 敏

(中国科学院昆明植物研究所)

摘要 从马槟榔(*Capparis masaikai* Lévl.)种子分离鉴定了二种甜蛋白：甜蛋白Ⅰ(mabinlin Ⅰ或MaⅠ)分子量MW11600，等电点pI 11.8；甜蛋白Ⅱ(mabinlinⅡ或MaⅡ)MW 10400，pI 11.3。另一组分mabinlinⅢ MW10200，pI 11.8，可能是提取过程产物。MaⅡ有84个氨基酸残基，比MaⅠ少15个。它们有80个氨基酸残基是共同的，都是缺丝氨酸和蛋氨酸的单一多肽链。MaⅠ还缺赖氨酸和酪氨酸。测不出有自由SH基。在8 *M*尿素中用巯基乙醇还原处理，两种甜蛋白分子都可转变为二聚体而失去甜味。

自去壳脱脂的种子干粉中提取MaⅠ和MaⅡ的得率依所用溶剂和提取条件而异。用50%丙酮水溶液提取，继用CM-纤维素分离，甜蛋白的得率达13%。用水或0.1*N* pH6.2磷酸缓冲液提取，得率低于1%。

关键词 马槟榔；甜味蛋白

我们曾报告马槟榔(*Capparis masaikai* Lévl.)种子引起持久性甜味的物质是一种碱性蛋白，称马槟榔甜蛋白(mabinlin)[2]。今对提取和分离甜蛋白的方法作了改进，证明甜蛋白是马槟榔种子的主要蛋白成分，提制的产率可达脱脂干种仁的13%。除了前曾报道的主要甜蛋白组分Ⅰ(mabinlinⅠ，略写MaⅠ)以外，尚分离到甜蛋白组分Ⅱ(mabinlinⅡ，略写MaⅡ)。对它们的特性作了分析比较，从而为进一步认识其甜味的决定因素和它们的相互关系提供线索。

材 料 和 方 法

1.材料 新鲜的成熟马槟榔果实用塑料布包扎，在室温下放置6天，待果肉变软，剥离出种子，阴干，存放于5°C冰箱中，存放期二年。使用时将种子去壳、粉碎，种子粉末用石油醚(沸点30—60°C)浸提脱脂，干种子含油量为30%。脱脂种子干粉于5°C存放备用。

2.甜蛋白的提取和分离

除试验说明外，均采用丙酮水溶液提取法。每克脱脂干粉加50%丙酮水溶液10—20毫升，在室温下快速搅拌提取5分钟，离心去残渣，向提取液中滴加1*N*氢氧化钠至试纸检查pH10左右，即发生沉淀，将沉淀离心分离出，加适量水，用1*N*盐酸调pH 6左右使蛋白溶解，该溶液供羧甲基纤维素柱层析分离。

本文于1984年5月7日收到。

* 本研究项目受国家科委资助。

羧甲基纤维素CM-52（Whatman产品）Na型悬于蒸馏水中装柱。样品液直接上柱，用蒸馏水洗到流出液280nm无吸收，然后用0.2*N*，0.45*N*和0.8*N*氯化钠溶液顺序分步洗脱，紫外检测器280nm检测，收集各蛋白质组分。各部分用Visking透析袋在室温下对蒸馏水透析脱盐，或用Diaflo YM-10超滤膜超滤脱盐，浓缩，经冰冻干燥后于5°C冰箱中保存。

3.电泳方法

甜蛋白的鉴定和分子量测定主要用SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳方法，采用Laemmli（1970）的Tris-HCl和Tris-甘氨酸缓冲系统[5]，胶浓度15%，用作分子量标准的蛋白质组为Bio Rad产品，共6种蛋白，分子量范围为10^4—10^5，见图4。

聚丙烯酰胺梯度电泳方法参见文献[1]。但用酸性电泳系统，分离胶pH 4.3，电极缓冲液为β-丙氨酸醋酸溶液，pH4.5[8]。样品液不加任何变性剂。电泳在8—10°C进行，恒压150伏，电泳16小时至电泳电流接近零。用作分子量标准的蛋白质为核糖核酸酶（MW 13500）和大豆胰蛋白酶抑制剂（MW 21500）。

4.光谱测定

甜蛋白用0.1*N* pH4.5醋酸钠缓冲液配制，浓度1 mg/ml左右，在岛津UV210A紫外分光光度计上测定紫外光谱，并测出$E_{280}^{1\%}$值。同样溶液用日立850萤光分光光度计测出萤光光谱，激发光波长280nm和295nm。

5.氨基酸分析

按常规6*N*盐酸水解程序，于日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。蛋白质中色氨酸含量按Spies（1967）方法，经链霉蛋白酶水解，用二甲基氨基苯甲醛（DAB）比色测定[9]。在由氨基酸含量推算氨基酸残基数时，由于甜蛋白不含甲硫氨酸，人为选定丙氨酸残基数为7，这样推算出的分子量与电泳测定的分子量基本相符。

6.巯基测定和双硫键还原裂解

蛋白质中SH基的测定按Ellman（1959）方法[4]，8mg DTNB溶于100ml0.1*N*磷酸氢二钠溶液（pH～8），蛋白质水溶液与DTNB溶液以1：1体积混合，在2小时内于412 nm处测定吸收值，计算出SH基浓度。

蛋白质的双硫键还原裂解反应按Needleman引述的Crestfield等人（1963）的程序[7]。在本试验中，还原裂解反应产物通过Sephadex G25柱，用蒸馏水洗脱，除去还原剂巯基乙醇和尿素，分出蛋白组分，再经CM-纤维素柱层析纯化，脱盐后供电泳分析。

结 果 与 分 析

1.甜蛋白的提取和分离

用丙酮水溶液提取和用羧甲基纤维素柱层析分离甜蛋白能得到良好效果。图1示用SDS-PAGE鉴定出马槟榔种子有6个显见的蛋白质成分，按分子量由大到小为g，a，f，b，d，c。组分g当用丙酮水溶液提取时即可排除。其他5个组分用羧甲基纤维

素柱层析得到很好分离（图2）。其中，由0.45N氯化钠洗脱的组分 c 具有甜味，称为甜蛋白Ⅱ（MaⅡ），等电点为11.3[2]。由0.8N 氯化钠洗脱所得组分 d 称为甜蛋白Ⅰ（MaⅠ），前曾报道，等电点11.8[2]。二者的甜味性质和强度相同。由100克脱脂种子干粉得 MaⅠ8.9克，MaⅡ1.4克，总得率为10.3%，这远远超过以前采用的用水提取和用硫酸铵分部沉淀法的得率。如果50%丙酮水溶液的甜蛋白提取液不调 pH 使蛋白沉淀，直接上 CM-纤维素分离，则甜蛋白的得率可达13%（表1）。

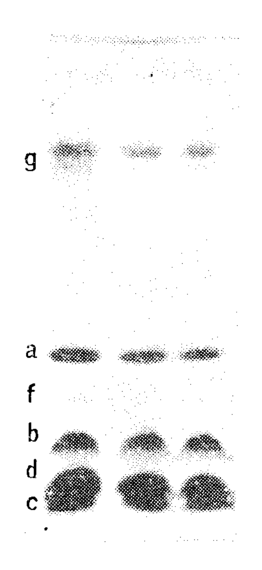
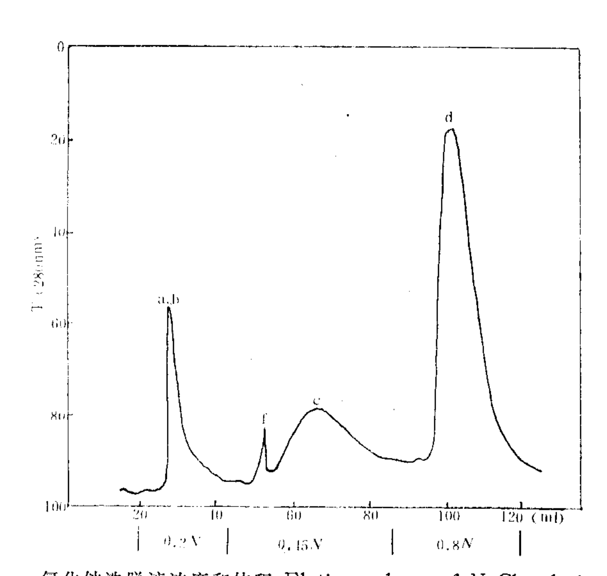


图1　马槟榔种子蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。显示a、b、c、d、f五个组分。甜蛋白MaⅡ（c），MaⅠ（d）。

Fig. 1　SDS-PAGE patterns of seed protein. Five components were showed, sweet protein MaⅡ(C), MaⅠ (d).



氯化钠洗脱液浓度和体积 Elution volume of NaCl solution

图2　马槟榔种子蛋白在CM-纤维素柱层析分离的洗脱曲线。组分C为MaⅡ，组分d为MaⅠ。

Fig. 2　Chromatography of seed protein on CM-cellulose column. c: Sweet protein MaⅡ, d: MaⅠ.

2.提取和分部条件对甜蛋白产率和组成的影响

由表1各项试验结果，在常温下用水或用 pH 6.2 的缓冲液提取甜蛋白，得率很低，仅为1%。在 pH 2 酸性条件下提取，或用10%甘油水溶液提取，或用较高浓度的硫酸铵溶液提取，得率提高到5%。用50%丙酮水溶液提取，得率高达13%。

用不同溶剂提取，甜蛋白中 MaⅠ和MaⅡ的相对量也不同。表1 No.1—3 组试验用缓冲液、稀盐酸和甘油水溶液提取时，MaⅠ/MaⅡ比值小于2。而No.5，6 试验组用丙酮水溶液提取，MaⅠ/MaⅡ比值大于6。

图3试验表明，脱脂干粉在下述二种提取条件下，提取液中有另一甜蛋白组分Ⅲ（MaⅢ）：将完好的去壳种子在常温下用水浸泡4天的浸出液；用甘油提取脱脂干粉，再将提取液溶于水。以上提出液的 SDS-PAGE 图上都有 d 和 e 二条带（图3—3，4）d 条为 MaⅠ，e 带相近于 c 带。用CM-纤维素柱层析，d 和 e 组分不为0.45N NaCl洗脱，而为0.8M NaCl 洗脱，说明它们等电点相似，因此 e 与 c（MaⅡ）分子量相近，

表1 不同提取方法对甜蛋白产率和组成的影响

Table 1 Yields of sweet protein with different extraction and fractionation methods from de-lipid seed powder

试验编号 Test No	提取溶剂和分部方法 Solvent and fractionation	产量Yield (mg/g)* Ma Ⅰ	Ma Ⅱ	总产率Total Yield (%)
1	pH6.2, 0.1N 磷酸缓冲液 phosphate buffer	1.0	4.8	0.58
2	pH 2 盐酸溶液 HCl solution	34.8	18.3	5.31
3	10% 甘油水溶液 aqueous glycerol	32.8	19.5	5.23
4	20% 饱和度硫酸铵提取 60% 饱和度硫酸铵沉淀 Extracting with 20% saturation and precipitating with 60% saturation of ammonium sulphate	44.7	10.7	5.54
5	50% 丙酮水溶液 aqueous acetone	124.0	15.3	13.93
6	50% 丙酮水溶液提取，pH10沉淀 Extracting with 50% aqueous acetone and then precipitating at pH 10	89.0	14.0	10.30

*注：以1克种子脱脂干粉加20ml提取溶剂提取，经CM-纤维素柱层析分离所得甜蛋白mg数。

*Note: Sweet protein (mg) was extracted with 20 ml of solvent and separated through CM-cellulose column.

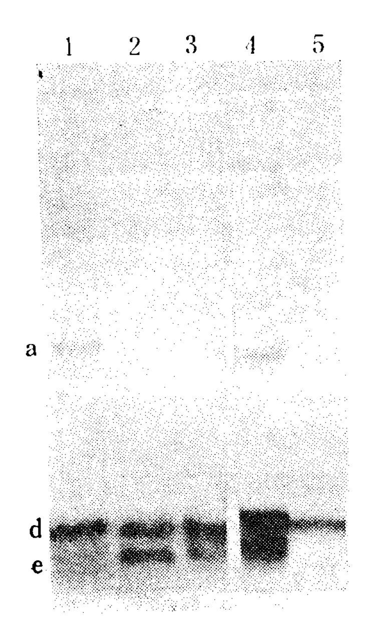


图3 马槟榔甜蛋白 Ma Ⅰ和 Ma Ⅱ的SDS-PAGE鉴定

图中1,5：去壳种子于5℃经水浸泡12小时，用醋酸酒精（1:3）固定24小时，脱脂，水提取，显示d带（Ma Ⅰ）。

3：脱脂干粉用甘油提取，提取液与水混合，显示d带（Ma Ⅰ）和e带（Ma Ⅱ）。

4：去壳种子用水浸泡4天，水浸出液显示d带（Ma Ⅰ）和e带（Ma Ⅱ）。

2：由4项种子的水浸出液通过羧甲基纤维素柱层析，0.8N NaCl洗脱组分，显示d和e带（Ma Ⅰ和Ma Ⅱ）。

Fig. 3 Identification of sweet protein Ma Ⅰ and Ma Ⅱ on SDS-PAGE. 1 and 5: In extract from the de-lipid seed powder after seed being soaked in water for 12 h at 5℃ and then in the mixture of acetate and ethanol (1:3) for 24 h. band d (Ma Ⅰ) was showed. 3: In extract from de-lipid powder with aqueous glycerol, band d (MaⅠ) and e (Ma Ⅱ) were showed. 4: In extract from seeds with water for 4 days, band d and e were showed. 2: In the 0.8 N NaCl elution fraction on CM-cellulose column of the extract mentioned in 4, bands d and e (Ma Ⅰ and Ma Ⅱ) were showed.

但等电点不同，称e为MaⅢ。如果去壳种子在8℃左右浸泡12小时，用酒精醋酸（3：1）固定液固定24小时，其脱脂干粉用水提取就只能得到MaⅠ（图3—1,5）。这说明e组分是与提取过程有关，但其来源尚未确定。

3.分子量

用SDS-PAGE测定分子量结果（图4），甜蛋白MaⅠ分子量为11600，MaⅡ为10400，MaⅢ为10200。由氨基酸组成分析推算结果（表2），MaⅠ为11611，MaⅡ为9980。以上二种方法测定结果相近。用Sephadex G50凝胶过滤法，MaⅠ和MaⅡ难以清晰分离，但仍确定MaⅠ分子量大于MaⅡ。用聚丙烯酰胺梯度电泳测定结果（图7），MaⅡ相近于SDS-PAGE法测定值，但MaⅠ的测定值偏小，反而小于MaⅡ，可能是该法测定中仍不能消除蛋白质等电点对迁移率的影响，导致MaⅠ迁移率偏大。

从以上不同方法测定结果，虽略有差别，但可以认为，甜蛋白分子均为单链而无亚基结构。

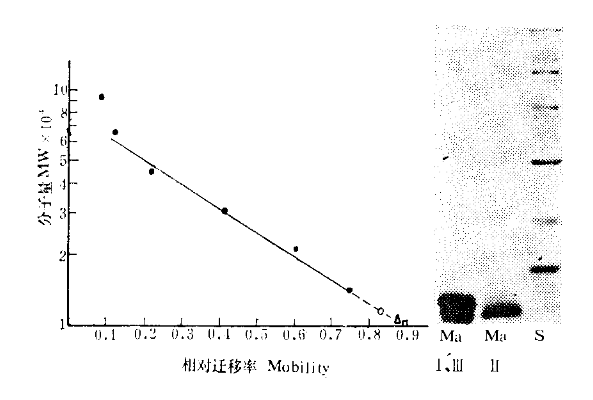


图4 马槟榔甜蛋白组分MaⅠ、MaⅡ、MaⅢ的分子量用SDS-PAGE法测定。

Fig. 4 Determination of molecular weight of MaⅠ, MaⅡ and MaⅢ in SDS-PAGE. Standard proteins S: Lysozyme (14400), Soybean Trypsin Inhibitor (21500), Carbonic Anhydrase (31000), Ovalbumin (45000), BSA (66200), Phosphorylase B (92000). Sweet protein: MaⅠ (○, 11600), MaⅡ (△10400), MaⅢ (□, 10200)。

4.光谱特性

甜蛋白MaⅠ和MaⅡ的紫外光谱明显不同（图5）。MaⅡ主要吸收峰在280 nm，此外在288.5nm和274.5nm有两个脊，明显为色氨酸的特征紫外光谱；此外在260nm左右也可见苯丙氨酸吸收。以上与MaⅡ的氨基酸组成有苯丙氨酸和色氨酸而无酪氨酸一致（表2）。MaⅡ的 $E_{280}^{1\%}=8.31$。甜蛋白MaⅠ紫外光谱可见酪氨酸和苯丙氨酸吸收，主峰278 nm，$E_{280}^{1\%}=6.55$，未见有明显的色氨酸吸收（图5），虽然MaⅠ也有色氨酸残基（表2）。

MaⅠ和MaⅡ在280nm激发光的萤光光谱均显示色氨酸的特征萤光（峰值355nm），MaⅠ的萤光光谱也有酪氨酸萤光（峰值300nm），但很弱。显然，酪氨酸吸收的光能传给色氨酸而呈现色氨酸萤光[6]。萤光光谱中峰值280 nm的吸收峰可能是Ragleigh散射光。

5.氨基酸组成

由表2测定结果，MaⅡ比MaⅠ减少了19个氨基酸残基，即：Pro〔6〕，Lys〔2〕，Gly〔2〕，Val〔2〕，Arg〔2〕，His〔1〕，Thr〔1〕，Tyr〔2〕，Leu〔1〕。因

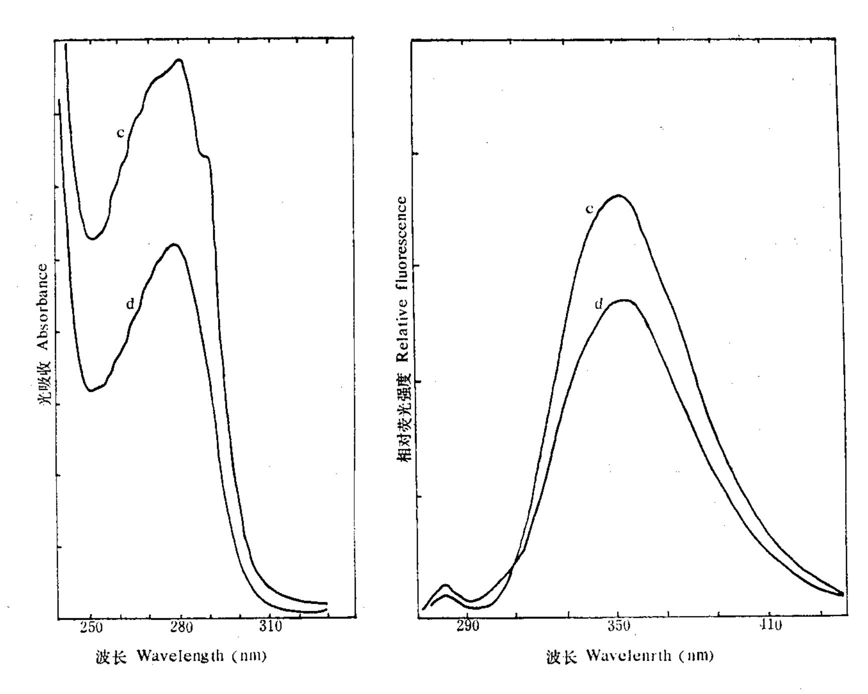


图5 马槟榔甜蛋白的紫外吸收光谱和荧光光谱。pH 4.5 醋酸缓冲液，曲线C为 MaⅡ， d 为MaⅠ。$E_{280}^{1\%}$: MaⅠ 6.55，MaⅡ 8.31。荧光激发光波长280nm。

Fig. 5 UV spectrum and fluorescence spectrum of the sweet protein. In pH 4.5 acetate buffer, MaⅠ (d), $E_{280}^{1\%}=6.55$; MaⅡ (c)，$E_{280}^{1\%}=8.31$. The exciting light wavelength of fluorescence was 280nm.

此，MaⅡ没有 Thr，Lys 和 Tyr。但MaⅡ比 MaⅠ多 Phe〔1〕，Asp〔2〕和 Ile〔1〕。这二个甜蛋白都没有甲硫氨酸和丝氨酸。它们绝大部分即80个氨基酸残基是共同的，其中最多的是 Arg，Glx 和 Pro。

6.SH 基和双硫键

用 DNTB 比色法没有检出二个甜蛋白有自由 SH 基（$<10^{-3}$ M/M），即使在变性剂 8 *M* 尿素或0.4% SDS 存在下也是如此。

在 8 *M* 尿素存在下用巯基乙醇进行还原裂解反应，反应产物通过 Sephadex G 25 除去变性剂和还原剂时，由 MaⅠ得到一个蛋白质洗脱峰 d′（见图 6），该组分在羧甲基纤维素柱上为0.2*N* NaCl所洗脱，其紫外光谱完全同于 MaⅠ，在 SDS-PAGE 图上与 MaⅠ相重合，即分子量约为10^4，但它在聚丙烯酰胺梯度电泳图上（见图 7），亦即在不解离为亚基的情况下，分子量约为1.8×10^4，为MaⅠ的二倍，是二聚体。MaⅡ经还原裂解处理后通过 Sephadex G 25 得到二个洗脱峰 C_1' 和 C_2'（图 6），在 CM-纤维素柱上，C_1'为0.2 *N* NaCl洗脱，C_2'为0.4 *N* NaCl洗脱，它们的紫外光谱完全同于 MaⅡ，在 SDS-PAGE图上都是分子量为10^4的蛋白带，但是在聚丙烯酰胺梯度电泳图上（图 7），C_2'的分子量约为10^4，与 MaⅡ相同，而 C_1'分子量约为 2×10^4，为 MaⅡ的二倍。显然，部分 MaⅡ成为二聚体。MaⅠ和 MaⅡ经还原裂解处理后的产物均无甜味。

表 2　马槟榔甜蛋白Ma Ⅰ 和Ma Ⅱ 的氨基酸组成

Table 2　Amino acid composition of sweet protein Ma Ⅰ and Ma Ⅱ

氨基酸种类 Amino acid	样品中氨基酸含量 Content (%)		每毫克样品氨基酸μM Content(μM) per mg		氨基酸残基数[1] Number of amino acid residues	
	Ma Ⅰ	Ma Ⅱ	Ma Ⅰ	Ma Ⅱ	Ma Ⅰ	Ma Ⅱ
Asp	4.03	6.63	0.31	0.50	4.8(5)	6.5(7)
Thr	0.72	0	0.06	0	0.9(1)	0 (0)
Ser	0.25	0.13	0.02	0.01	0.4(0)	0.2(0)
Glu	18.29	19.68	1.12	1.34	17.8(18)	17.4(18)
Gly	2.19	1.88	0.29	0.25	4.6(5)	3.2(3)
Ala	3.91	4.83	0.44	0.54	7.0(7)	7.0(7)
Cys	4.03	4.57	0.33	0.38	5.3(5)	4.9(5)
Val	3.34	2.91	0.29	0.24	4.5(5)	3.1(3)
Met	0.30	0	0.02	0	0.3(0)	0 (0)
Ile	2.53	3.95	0.19	0.30	3.1(3)	3.9(4)
Leu	7.13	8.31	0.54	0.63	8.7(9)	8.2(8)
Tyr	2.07	0.37	0.12	0.02	1.8(2)	0.3(0)
Phe	3.22	4.64	0.20	0.28	3.1(3)	3.6(4)
Lys	1.96	0.39	0.13	0.03	2.1(2)	0.3(0)
His	2.65	1.71	0.17	0.11	2.7(3)	1.5(2)
Arg	17.37	18.13	1.00	1.04	15.9(16)	13.5(14)
Pro	10.47	6.75	0.91	0.59	14.4(14)	7.6(8)
Try	1.50	1.87	0.07	0.09	1.2(1)	1.2(1)
NH_3	0.87	1.83	0.57	1.08	9.1(9)	13.8(14)
合计Total	86.93	88.48	—	—	99	84
分子量MW[2]	—	—	—	—	11611	9980

注：1）以Ala的残基数7.0为基数计算。2）根据氨基酸残基数计算，NH_3以酰胺处理。

Notes：1）Calculated on basis of being 7 of Ala residues.

2）Calculated on basis of amino acid residue number.

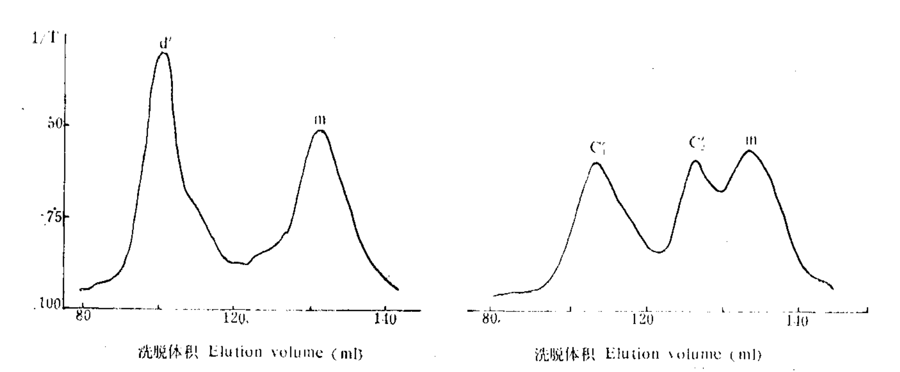


图 6　马槟榔甜蛋白经还原裂解处理的反应液经Sephabdex G 25 柱的洗脱曲线。左：由甜蛋白Ma Ⅰ 得 d′。右：由Ma Ⅱ 得C_1′和C_2′二个蛋白组分。m为巯基乙醇吸收峰。

Fig. 6　Gel filtration patterns of the reductive cleavage products of Ma Ⅰ (left) and Ma Ⅱ (right). Elution fraction d′ was from Ma Ⅰ, fractions C_1′ and C_2′ were from Ma Ⅱ. Fraction m was β-mecraptoethanol.

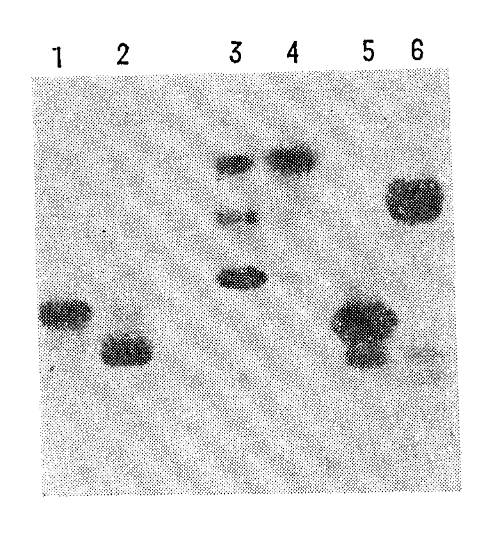


图 7 马槟榔甜蛋白聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳。 图中 3:标准蛋白核糖核酸酶（MW13500）和大豆胰蛋白酶抑制剂（MW21500）的混合物；1．甜蛋白 Ma Ⅱ；2．Ma Ⅰ；4、5：Ma Ⅱ经还原裂解处理的产物 C_1'和C_2'；6：Ma Ⅰ经还原裂解处理的产物d'（见图 6）。C_1'和d'的分子量分别是 Ma Ⅱ 和 Ma Ⅰ 的二倍。

Fig. 7 Gradient -PAGE pattern of Sweet protein. 3: The mixture of standard proteins, ribonuclease (MW 13500), soybean trypsin inhibitor (MW 21500). 1: Ma Ⅱ, 2: Ma Ⅰ. 4, 5: The components c_1' and c_2' from Ma Ⅱ respectively. 6: The d' from Ma Ⅰ. (see Fig. 6) The c_1' and d' were double the molecular weight of the Ma Ⅱ and Ma Ⅰ respectively.

以上试验说明，天然马槟榔甜蛋白分子均为单链，分子内部的 5 个半胱氨酸残基至少形成二对双硫键，当经过还原裂解后除去变性剂和还原剂时，不能复原，而在二个分子间形成双硫键成为二聚体，Ma Ⅰ 比 Ma Ⅱ 更易发生这种现象。可以推论，分子内部的双硫键对甜味性质是重要的。

讨 论

从马槟榔种子可分离出二种甜蛋白成分：Ma Ⅰ 分子量11600，等电点 11.8； Ma Ⅱ 分子量10400，等电点11.3。在提取过程中可能产生 Ma Ⅲ，分子量10200，等电点约11.8。它们都是单链。比较氨基酸组成，推测 Ma Ⅱ 是 Ma Ⅰ 丢失一条富于脯氨酸的端肽链，经过修饰产生的。它们共同有由80个氨基酸残基组成的多肽链，这决定共有的甜味性质。该多肽链未能测出有自由 SH 基，而双硫键的存在对甜味是重要的。这些都与甜蛋白 thaumatin 类似，但马槟榔甜蛋白分子量只有 thaumatin 的一半左右[10]。与甜蛋白 monellin 分子量相近，但特性上差异较大[3]。

马槟榔甜蛋白在去壳种仁中含量高达10％以上，是种子蛋白的主要成分。甜蛋白的提取产率和二个甜蛋白的相对量因提取条件不同而显著不同，根据本试验结果，推论在提取过程中甜蛋白与细胞中某种成分形成不易溶于水的结合状态。甜蛋白在细胞中究竟以何种状态贮存于种子中，值得进一步研究。

根据本试验结果，我们前文[2]中的图 4 各组分编号应与本文图 1 各色带相对应，按泳动距离由小到大为 g、a、f、b、c、d。前文中图 5 的 c 应为 b。

致谢：美国 Pennsylvania 大学 R. H. Cagan 教授寄来他们对甜蛋白 monellin 研究结果的一套复印本给我们参考，谨致谢意。

参 考 文 献

〔1〕张龙翔等编，1981：生化实验方法和技术，第119—123页，实验二十四。人民教育出版社。
〔2〕胡忠、何敏，1983：马槟榔甜蛋白的研究Ⅰ.提取、纯化和某些特性。云南植物研究，5：207—212。
〔3〕Cagan, R. H. and J. A. Morris, 1976: The sulfhydryl group of monellin, Its chemical reactivity and importance to the sweet taste. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152: 635—640.
〔4〕Ellman, G. C. 1959: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70—77.
〔5〕Laemmli, U. K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680—685.
〔6〕Morton, R. A. 1975: Biochemical Spectroscopy, Vol. I. Adam Hilger, London.
〔7〕Needleman, S. B. ed., 1975: Protein sequence determination. Springer-Velag, P. 193.
〔8〕Reisfeld, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams, 1962: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195: 281.
〔9〕Spies, J. R. 1967: Determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 39: 1412.
〔10〕Van del Wel, H. and K. Loeve, 1972: Isolation and characterrization of thaumatin Ⅰ, Ⅱ, the sweet-taste protein from *Thaumatococus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.* 31: 221—225.

STUDIES ON MABINLIN, THE SWEET PROTEIN FROM SEEDS OF CAPPARIS MASAIKAI

Ⅱ. COMPARISON OF MABINLIN Ⅰ TO MABINLIN Ⅱ

Hu Zhong, Peng Liping and He Min

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract Two components of sweet protein were saparated and characterized: mabinlin Ⅰ (Ma Ⅰ), the major one, with MW of 11600 and isoelectric point pI of 11.8, and mabinlin Ⅱ (Ma Ⅱ) with MW of 10400 and pI of 11.3. Another component mabinlin Ⅲ (Ma Ⅲ) with MW of 10200 and pI of about 11.8 was found to be produced during the extraction. Ma Ⅱ contains 84 amino acid residues that are fewer 15 amino acid residues than Ma Ⅰ, of which 6 residues are Pro. These proteins are all single polypeptide chains lacking Ser and Met. 80 amino acid residues are common in Ma Ⅰ and Ma Ⅱ molecules in which Arg, Glx and Pro are dominant ones. No SH group was detected. After treatment of reductive cleavage with β-mercaptoethanol in 8 *M* urea, these protein molecules were transformed into dimers and lost the sweet nature.

The yield and the ratio of Ma Ⅰ to Ma Ⅱ extracted from the lipid-free

powder of decorticated seeds depended on the solvent used and the conditions of extraction. A highest yield of 13% was obtained in extraction with 50% aqueous solution of acetone and saparation through CM-cellulose column chromatography. While extraction with watar or 0.1*M* pH6.2 phosphate buffer the yield was less than 1% because of the less accessibility of the protein in combined state.

Key words *Capparis masaikai*; Sweet protein